
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SILVIO RANZI, MILA PROTTI NECCHI, PAOLO CITTERIO

Impiego dei diagrammi di «salting-out» per lo studio della sistematica zoologica

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.6, p. 791–803.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_6_791_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Impiego dei diagrammi di « salting-out » per lo studio della sistematica zoologica* ^(*). Nota di SILVIO RANZI, MILA PROTTI NECCHI e PAOLO CITTERIO, presentata ^(**) dal Corrisp. S. RANZI.

In una serie di ricerche vennero prese in esame le variazioni presentate dai diagrammi di « salting-out » durante lo sviluppo embrionale ⁽¹⁾, diagrammi ottenuti col metodo di Derrien ⁽²⁾ leggermente modificato. Come uno di noi ebbe occasione di dire, queste ricerche ci posero sull'avviso dell'esistenza di diagrammi di « salting-out » caratteristici dei diversi gruppi animali e ci spinsero a intraprendere lo studio dei diagrammi degli adulti ⁽³⁾. In questa Nota ⁽⁴⁾ vogliamo presentare i dati in questione, che al punto cui sono giunte le nostre ricerche, sembrano permettere un tentativo di sistematica zoologica basato sulla solubilità delle molecole proteiche.

Il metodo seguito è esposto nella fig. 1 e nella sua spiegazione. Oltre a questo metodo, in alcuni casi ne abbiamo seguiti due altri, del risultato dei quali si dirà anche qualcosa. Il primo è stato quello di aggiungere alla soluzione, delipidata, il 30% di urea, lasciare incubare una notte in ghiacciaia ed eseguire poi sul supernatante dopo centrifugazione (15 minuti a 5000 giri) il « salting-out ». Il secondo è quello di ultracentrifugare, con la Spinco preparativa a 40.000 giri per 30 minuti, la soluzione delipidata ed eseguire il « salting-out » sul supernatante.

Anellida: Tra i Policheti (fig. 2) ⁽⁵⁾ due Eunicidi studiati mostrano tre punte 50, 65, 75 e un diagramma di « salting-out » ben sovrapponibile. Nereididi, Neftididi e Gliceridi mostrano invece un diagramma diverso dal precedente, ma identico tra loro, punte a 40, 90, 60. I Sedentari hanno un diagramma con punte a 40, 60, 80. *Lumbricus rubellus* Hoffm., *Hirudo medicinalis* L. e *Bonellia viridis* Rol. ♀ mostrano un diagramma di « salting-out » praticamente identico tra loro con punta preminente a 45 e punte a 90, 75, 60, 35 (fig. 3).

(*) Gruppo di ricerca per l'Embriologia del C.N.R. per lo studio del Differenziamento presso l'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(**) Nella seduta del 17 giugno 1965.

(1) I lavori sono riassunti in S. RANZI, « Advances in Morphogenesis », 2, 221 (1962), che riporta anche la completa bibliografia.

(2) Y. DERRIEN, E. P. STEYN-PARVÉ, M. COTTE e G. LAURENT, « Biochim. Biophys. Acta », 9, 49 (1952).

(3) S. RANZI, « Istituto Lombardo (Rend. Sc.) », B 64, 297 (1960).

(4) La presente Nota è stata stesa quando i dati raccolti sui Molluschi sono sembrati sufficienti, unitamente a quelli da anni raccolti sui Vertebrati, a quanto sugli Echinodermi era stato pubblicato e a quanto si va raccogliendo sugli Anellidi. Ancora non abbiamo studiato sistematicamente gli Artropodi e pertanto di questo gruppo non si farà parola. Nella esposizione le punte vengono indicate col numero che contraddistingue la massima precipitazione.

(5) Specie studiate: Eunicidi: *Eunice rousseaui* Quatr., *Diopatra neapolitana* (Delle Chiaje); Nereididi: *Nereis falsa* Quatr.; Neftididi: *Nephtys hombergi* Aud. e M.E.; Gliceridi: *Glycera unicornis* Savigny; Sedentari: *Chaetopterus variopedatus* (Rénier), *Spirographis spallanzanii* (Viviani). I dati provengono da ricerche non pubblicate di V. Parisi e coll.

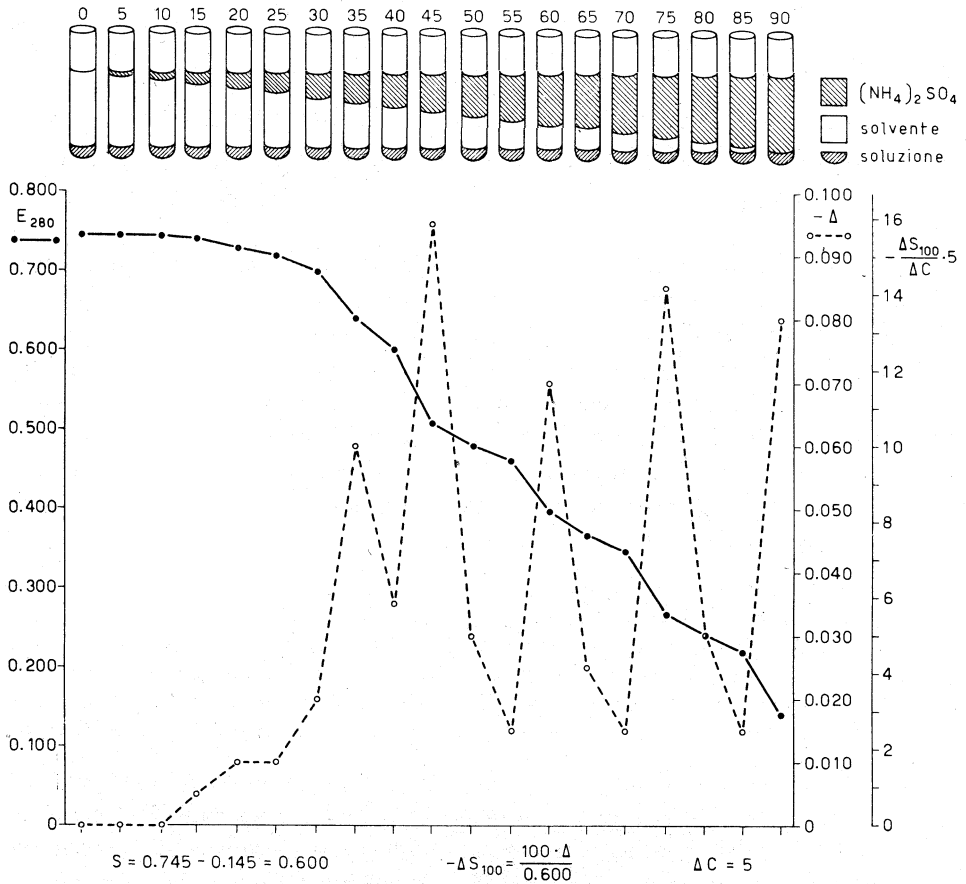


Fig. 1. — Maniera di ottenere il diagramma di «salting-out» di un adulto di *Lumbricus rubellus*.

1 gr di polvere liofilizzata dell'intero corpo dell'animale era disciolto in 100 ml di liquido di Weber ed Edsall (soluzione 0,6 M KCl alcalinizzata) (tutte le manipolazioni eseguite in camera fredda a 2°C). Dopo una notte la soluzione era centrifugata per 15 minuti 5000 r.p.m.; l'assorbimento veniva letto allo spettrofotometro di Beckman a 280 m μ dopo diluizione col solvente. Si estraevano poi i lipidi sbattendo ripetutamente la soluzione con etere etilico in un imbuto separatore. Con la soluzione delipidata si preparavano 19 campioni di 1 ml che venivano posti in 19 tubi e diluiti il primo con 9 ml di liquido di Weber ed Edsall (WE); il secondo con 8,5 ml WE e 0,5 ml di una soluzione di ammonio solfato satura in WE (AS); il terzo con 8 ml di WE e 1 ml di AS; il quarto con 7,5 ml di WE e 1,5 ml di AS e così di seguito finché il diciannovesimo era diluito con 9 ml di AS (la serie di campioni è indicata in alto nella figura). Dopo una notte in ghiacciaia si centrifugava per 15 minuti a 5000 giri e si leggeva l'assorbimento a 280 m μ allo spettrofotometro di Beckman. Nel diagramma sono indicati sulle ascisse i diversi tubi (concentrazione di AS) e sulle ordinate a sinistra le letture allo spettrofotometro. I valori corrispondenti sono quelli indicati dalla linea a tratto unito. Nella prima ordinata a destra sono le differenze tra due valori successivi. Nella seconda ordinata a destra i valori sono espressi come percentuale della sostanza che viene analizzata con questo metodo $-\frac{\Delta S_{100}}{\Delta C} \cdot 5$. Il calcolo eseguito per determinare la quantità di sostanza S e S₁₀₀ è riportato sotto il diagramma. Questi diagrammi sono riproducibili con la stessa polvere anche dopo anni. È però indispensabile l'esatto controllo della temperatura, sia per i campioni, sia per i solventi, sia per la vetreria usata (tutto deve essere a 2°C).

Le tre specie studiate ⁽⁶⁾ di Sipunculoidi (fig. 3) mostrano un diagramma simile, ma senza la punta a 35 e cioè la punta preminente a 45 e altre punte a 75, 90, 60.

⁽⁶⁾ Specie studiate: *Sipunculus nudus* L., *Golfingia vulgare* de Blainv. (proveniente da Roschoff), *Phascolosoma granulatum* Leuk. I dati provengono da ricerche non pubblicate di V. Parisi e coll.

Mollusca: Per questo tipo si è reso necessario lo studio di animali muniti di conchiglia e di animali in cui essa era stata rimossa onde evitare che il CaCO_3 del guscio avesse influenza sui risultati, mettendo in evidenza così la quantità di sale che passa in soluzione.

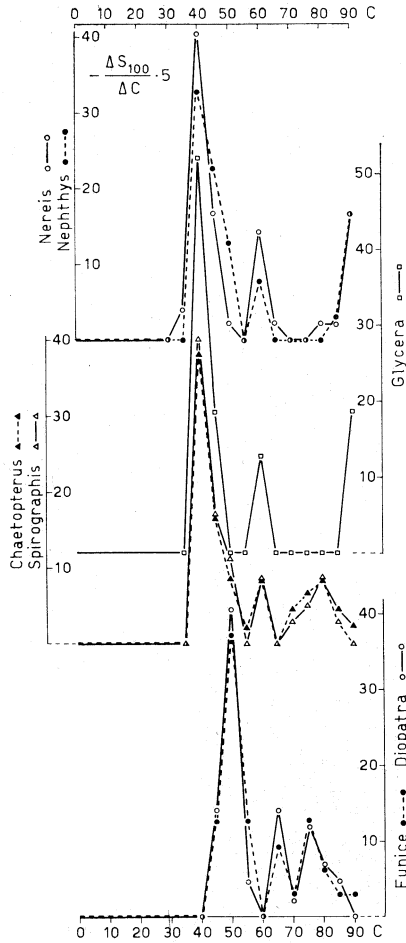


Fig. 2. - Diagrammi di «salting-out» di vari Policheti.

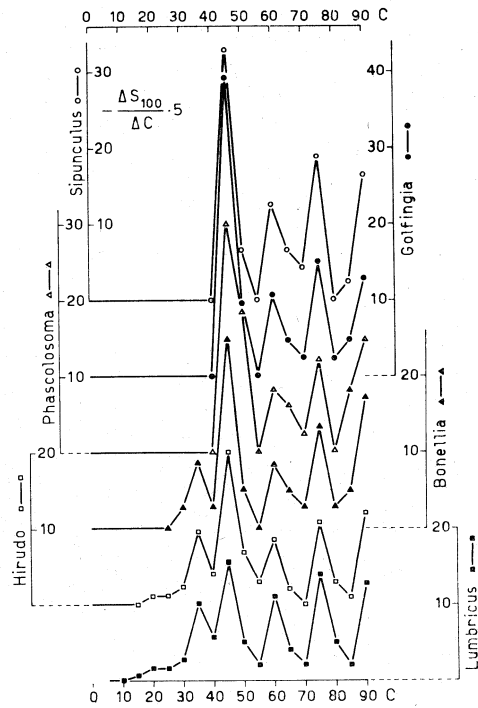


Fig. 3. - Diagrammi di «salting-out» di Oligocheti, Irudinei, Echiuridi e di vari Sipunculoidi.

Il «salting-out» del *Chiton olivaceus* Spengel (Poliplacofori) (senza conchiglia) dimostra due punte molto marcate 45, 85 cui si associano due punte minori 65 e 55 (molto piccola) (fig. 4).

Nei Gasteropodi⁽⁷⁾, studiati senza conchiglia (figg. 4 e 5), si osservano anche quattro punte, di cui tre comuni al *Chiton*, 45 preminente, alte anche

(7) Specie studiate: Prosobranchi: *Patella coerulea* L., *Viviparus ater* (Cristof. e Jan), *V. contectus* Millet, *Pterotrachea coronata* Forsk., *Murex brandaris* L. e *M. trunculus* L.; Opistobranchi: *Aplysia punctata* Cuv., *Fimbria leporina* L.; Polmonati: *Limnaea stagnalis* L., *Helix pomatia* L., *H. aspersa* Müller, *Arion rufus* L.

65 e 85 mentre la quarta, 75, è più piccola e in *Helix* a volte è assente, altre volte appena accennata. Particolarmente degno di nota il fatto che un prosobranchio, adattato a vita planctonica, e di conseguenza ricchissimo di acqua, la *Pterotrachea*, ha le stesse punte degli altri Gasteropodi e non è in pratica da questi distinguibile, mentre non è possibile vedere differenze tra Prosobranchi e Opistobranchi (di acqua dolce e marini: bentonici e planctonici). I Polmonati studiati si lasciano invece riconoscere perché la frazione 75 è ridotta, tanto che alcune volte non si vede nel diagramma.

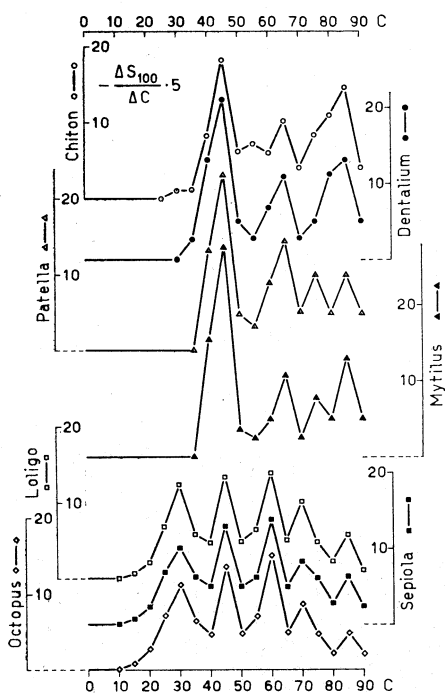


Fig. 4. - Diagrammi di « salting-out » di Anfineuri, Scafopodi, Gasteropodi, Lamellibranchi tutti senza conchiglia e di vari Cefalopodi.

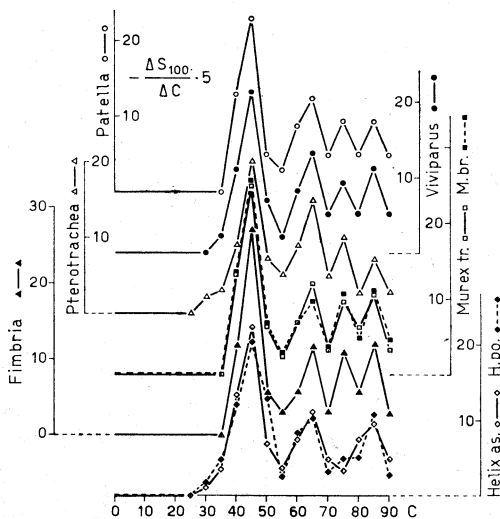


Fig. 5. - Diagrammi di salting-out di vari Gasteropodi senza conchiglia.

as., *H. aspersa*; H. po., *H. pomatia*; tr., *M. trunculus*; M. br., *M. brandaris*.

Nel *Dentalium dentale* L. (Scafopodi) (fig. 4) si osservano tre punte evidenti che in ordine di altezza sono 45, 85, 65. Assenza di 75 che corrisponde a proteine in posizione 80 e pertanto poco evidenti.

Il diagramma dei Lamellibranchi⁽⁸⁾ (figg. 4 e 6) è simile a quello dei Gasteropodi. Le punte sono 45 preminente, 85 e 65 e in 75 una punta che però è assente negli Eulamellibranchi eterodonti e schizodonti.

Schematizzando quanto fin qui riferito, Poliplacofori, Gasteropodi, Scafopodi, Lamellibranchi presentano una punta preminente a 45. Le due punte

(8) Specie studiate: *Anisomyaria*: *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Ostrea edulis* L.; *Heterodonta*: *Cardium edule* L.; *Schizodonta*: *Unio mancus* Lam.; *Adapedonta*: *Ensis ensis* L..

a 65 e 85 minori sono sempre presenti. La punta a 75 in generale è più bassa ma manca o è ridotta nei Poliplacofori, nei Gasteropodi polmonati, negli Scafopodi, nei Lamellibranchi schizodonti ed eterodonti.

Completamente diverso è il diagramma di «salting-out» dei Cefalopodi (9) (fig. 4) in questi si osservano cinque punte, che in ordine di altezza sono 60, 45, 30, 70, 85 e cioè un quadro completamente diverso, senza differenze tra specie planctoniche e bentoniche.

È vero che il salting-out dei Cefalopodi è stato eseguito su animali interi, ma il loro diagramma è completamente diverso dal diagramma di Gasteropodi e Lamellibranchi analizzati con conchiglia (fig. 7). Questo diagramma presenta

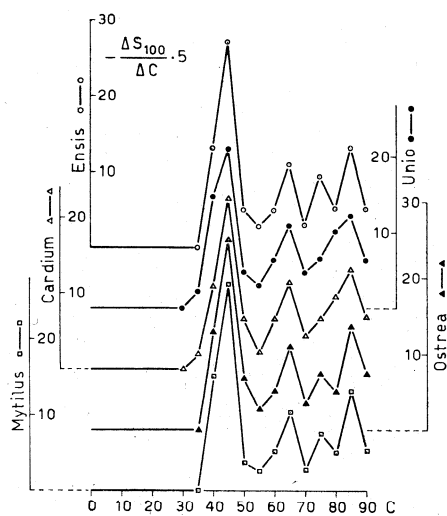


Fig. 6. - Diagrammi di «salting-out» di vari Lamellibranchi senza conchiglia.

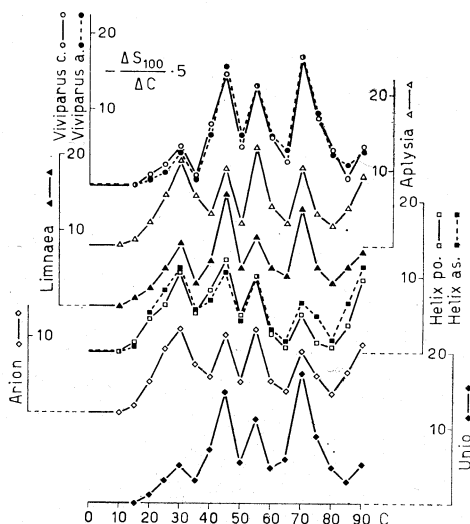


Fig. 7. - Diagrammi di «salting-out» di vari Gasteropodi e Lamellibranchi con conchiglia.

as., *H. aspersa*; po., *H. pomatia*; a., *V. ater*; c., *V. contectus*.

cinque punte 30, 45, 55, 70, 90 di cui 55 e 70 più alte nelle forme con conchiglia cospicua (*Viviparus*, *Limnaea*, *Unio*), le altre più sviluppate nelle forme con conchiglia interna (*Aplysia*, *Arion*).

Si può, in base a tutto questo, affermare che esiste un diagramma primitivo rappresentato dalle tre punte 45, 65, 85 cui quasi sempre si associa la punta a 75. Questo si trova in tutti i Poliplacofori, Gasteropodi, Scafopodi, Lamellibranchi studiati, i Cefalopodi invece hanno un diagramma diverso e caratteristico.

Il sistema di studiare le proteine denaturate per azione di urea (fig. 8) ha dato il seguente risultato: Poliplacofori, Gasteropodi e Lamellibranchi

(9) Specie studiate: *Loligo vulgaris* Lam., *Sepiola rondeletii* Gesner, *Octopus vulgaris* Lam..

due punte 60 (più alta) e 75; Cefalopodi pure due punte ma spostate 70 più alta e 55. Nei Gasteropodi e Lamellibranchi studiati con conchiglia 60 (più alta) e 75 nelle forme con grande conchiglia (questo diagramma è identico a quello degli animali studiati senza conchiglia); 70 (più alta) e 55 nelle forme con conchiglia piccola (*Aplysia*, *Helix*, *Arion*) (questo diagramma è identico a quello ottenuto per i Cefalopodi).

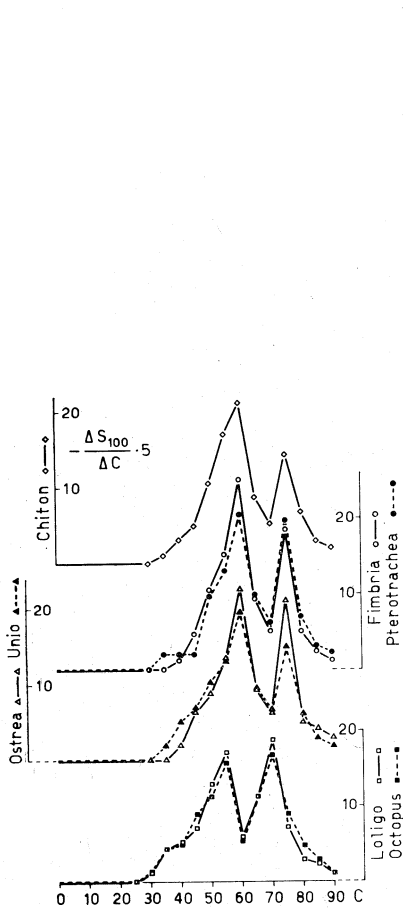


Fig. 8. - Diagrammi di « salting-out » di proteine di vari Molluschi denaturate con urea.

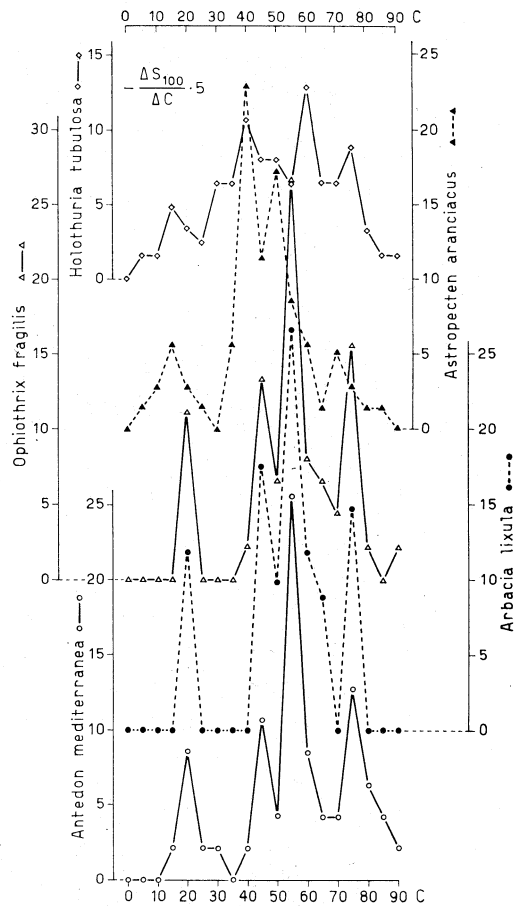


Fig. 9. - Diagrammi di « salting-out » di rappresentanti di diverse classi di Echinodermi.

(Da PAJETTA e SAMUELLI, op. cit.).

Echinodermata ⁽¹⁰⁾: In questi animali esiste un diagramma comune a Crinoidi, Echinoidi, Ofiuroidi (in complesso studiate otto specie) e due diagrammi peculiari degli Asteroidi (due specie studiate) e degli Oloturoidi (tre specie studiate) (fig. 9).

(10) E. PAJETTA e C. SAMUELLI, « Pubbl. Staz. Zool. Napoli », 32, I (1961).

Chordata: Il «salting-out» di *Ciona intestinalis* L. (Tunicati) presenta punte che in ordine di altezza sono 60, 40, 75, 30, 15.

Quello dell'anfiosso (*Branchiostoma lanceolatum* Pall.) (Cefalocordati) è invece con punte a 45, 70, 55, 30, 85, 25 (fig. 10).

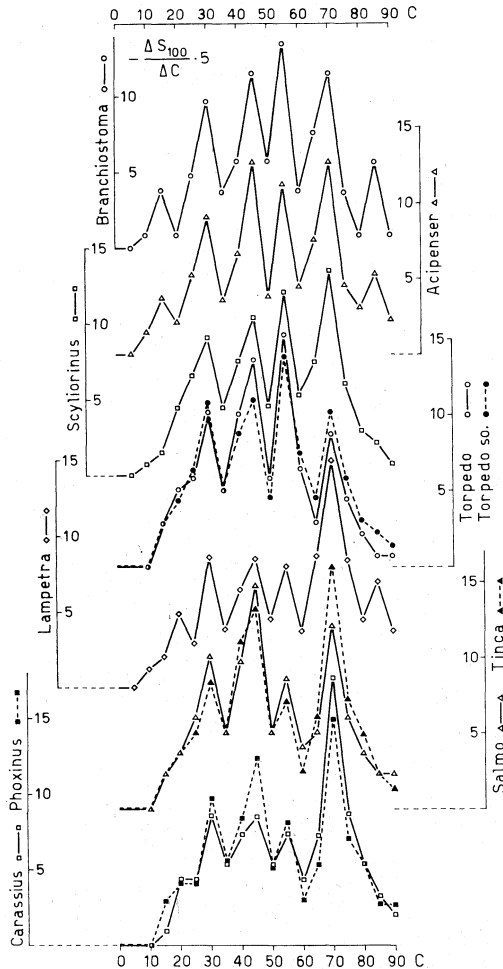


Fig. 10. — Diagrammi di «salting-out» di Cefalocordati, Ciclostomi e Pesci.

so., *T. marmorata* senza organo elettrico.

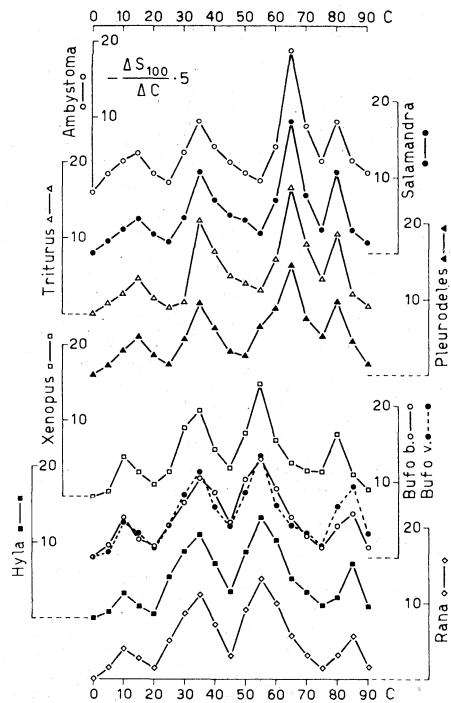


Fig. 11. — Diagrammi di «salting-out» di vari Anfibi Urodeli e Anuri.

b., *B. bufo*; v., *B. viridis*.

Il diagramma dell'anfiosso è riconducibile a quello dei Pesci ⁽¹¹⁾ (fig. 10); tra questi il più simile sembra quello dell'*Acipenser*, che ha le sei punte dell'anfiosso, mentre gli altri Pesci hanno solo le quattro maggiori con premi-

(11) Pesci studiati: Selaci: *Scyliorhinus canicula* L., *Torpedo marmorata* Risso; Condrostei: *Acipenser sturio* L.; Teleostei: *Salmo irideus* Gibbons, *Tinca tinca* L., *Carassius auratus* L., *Phoxinus phoxinus* L..

nente 70, molto marcata nei Teleostei, meno nei Selaci. Simile al diagramma dei Teleostei è quello di *Lampetra planeri* (Ciclostomi) che però ha in più la piccola punta 85 caratteristica di anfioso e *Acipenser* e una punta 20 che è accennata in *Carassius* e *Phoxinus*.

Se la soluzione su cui si esegue il «salting-out» è centrifugata a 40.000 giri per 30 minuti prima di iniziare il frazionamento, le punte si riducono a due nei Teleostei 70 e 55 (più piccola) mentre nei Selaci e nell'*Acipenser* se ne vede anche un'altra (45). Tenendo conto di questo si possono ben differenziare i due gruppi.

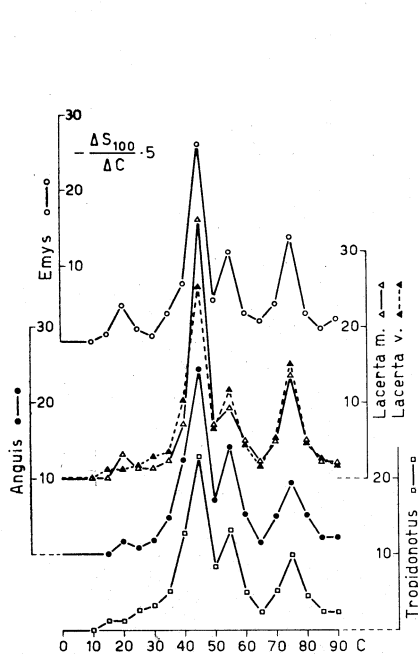


Fig. 12. - Diagrammi di «salting-out» di vari Rettili:

m., *L. muralis*; v., *L. viridis*.

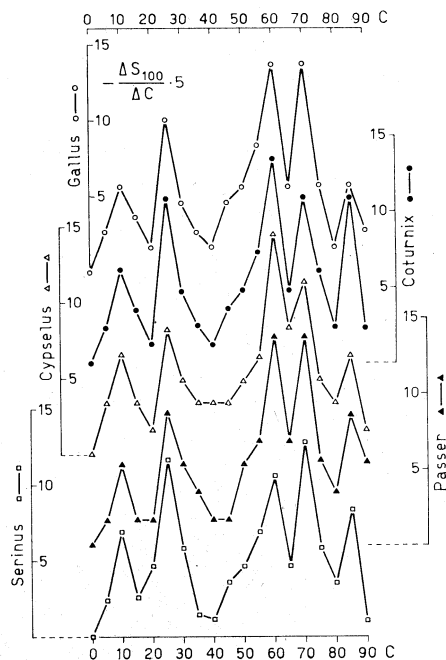


Fig. 13. - Diagrammi di «salting-out» di vari Uccelli.

Gli Anfibi Urodeli ⁽¹²⁾ hanno quattro punte 65, 35, 80, 15 mentre gli Anuri 55, 35, 10 e una punta a 85 che può essere in qualche caso (*Xenopus*) a 80. I due «salting-out» sono nettamente diversi.

Il diagramma di «salting-out» dei Rettili (fig. 12) (sono stati studiati Cheloni e Squamati) ⁽¹³⁾ mostra una punta a 45 e punte minori a 55 e 75; un componente minore si vede come una piccola punta o si intravede come un tratto orizzontale a 20.

(12) Anfibi studiati: Urodeli: *Ambystoma tigrinum* Green (neotenic), *Salamandra maculosa* Laur., *Triturus cristatus* (Laur.), *Pleurodeles waltli* Michah.; Anuri: *Xenopus laevis* L., *Bufo bufo* L., *B. viridis* Laur., *Hyla arborea* L., *Rana esculenta* L..

(13) Rettili studiati: *Chelonia*: *Emis orbicularis* L.; *Lacertilia*: *Anguis fragilis* L., *Lacerta viridis* L., *L. muralis* Laur.; *Ophidia*: *Tropidonotus natrix* L..

Gli Uccelli ⁽¹⁴⁾ (fig. 13) sono caratterizzati da cinque punte 60 e 70 preminenti, segue una punta a 25 e due punte a 85 e 10. Sono stati studiati Galliformi, Apodiformi e Passeriformi e non si sono trovate differenze.

I Mammiferi ⁽¹⁵⁾ (fig. 14) presentano le punte 60, 30, 85, 10. A queste quattro in *Sorex*, *Vespertilio*, *Rattus* e *Mus* se ne aggiunge una quinta a volte cospicua a 70 che però manca in *Cricetus*. Si noti però che quanto ho detto

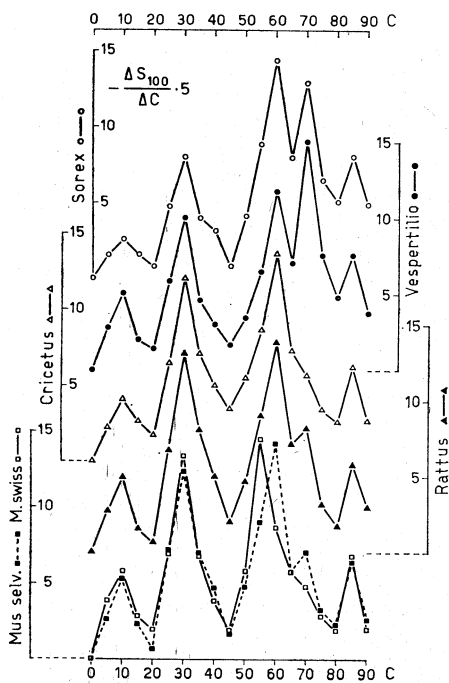


Fig. 14. - Diagrammi di «salting-out» di vari Mammiferi.

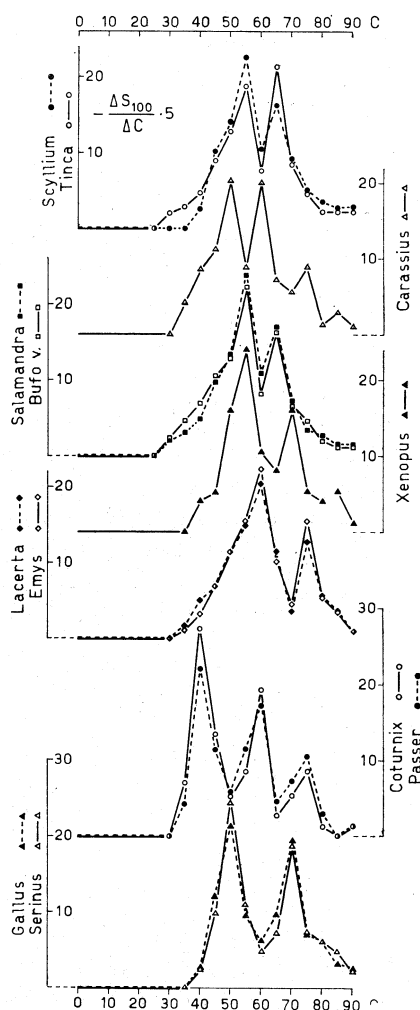


Fig. 15. - Diagrammi di «salting-out» di proteine denaturate di vari Vertebrati.

v., *B. viridis*.

(14) Uccelli studiati: *Galliformes*: *Gallus gallus* L., *Coturnix coturnix* L.; *Apodiformes*: *Cypselus apus* (L.); *Passeriformes*: *Passer domesticus* L., *Serinus canaria* L..

(15) Mammiferi studiati: *Insectivora*: *Sorex araneus* L.; *Chiroptera*: *Vespertilio murinus* L., *Rodentia*: *Cricetus cricetus* L., *Mus musculus* L., *Rattus rattus* L..

si riferisce a *Mus musculus* selvatico catturato in campagna. Se invece si studia la razza bianca di allevamento (Swiss albina) il diagramma è diverso 55, 30, 85, 10 e cioè la punta a 60 è sostituita da una punta a 55 e la punta a 70 manca. Siamo qui in presenza di un cambiamento di «salting-out» in rapporto all'addomesticamento del quale daremo tra breve altri esempi.

La denaturazione con urea mostra altri fatti (fig. 15). Gli Anamni presentano due punte 55 e 65 in generale ben sviluppate. Negli Amnioti si osservano sempre due punte 60 e 75 (scritte in ordine di altezza), ad esse però negli Uccelli e Mammiferi se ne aggiunge una terza più alta (Uccelli 40, Mammiferi 35). Questi diagrammi di proteine denaturate presentano però eccezioni. Diagrammi diversi da quelli del gruppo si osservano in: *Carassius auratus*, axolotl di *Ambystoma tigrinum*, *Pleurodeles waltli*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Serinus canaria*. Quando compilammo l'elenco di queste eccezioni ci colpì il fatto che tutti gli animali in questione erano animali allevati artificialmente e quindi pensammo che le cure che l'allevatore mette nel nutrire gli animali portano a una struttura che, a livello molecolare, ha una stabilità diversa da quella degli animali selvatici. Si ripete cioè al livello molecolare il fatto ben noto che l'animale allevato artificialmente, specie se di razza domestica, è diverso e, in generale, questa diversità si accompagna a una minor resistenza a fattori ambientali. Il diagramma anomalo delle proteine totali del topino Swiss albino è evidentemente correlato al fatto che questa razza è domestica, anzi, in questo caso, con opportuni incroci, si potrà appurare se detto diagramma è effetto di mutazioni di caratteri tanto importanti da interferire con i caratteri molecolari che riguardano il gruppo sistematico. A favore della presenza di siffatte mutazioni è il fatto che *Mus* selvatici catturati in natura e allevati in cattività per sei mesi nelle identiche condizioni dei Swiss albini non avevano acquistato il diagramma dei «salting-out» dei Swiss albini. Però la differenza tra il diagramma di *Bufo viridis* della fig. 11 e quello precedentemente pubblicato⁽¹⁶⁾ potrebbe essere in rapporto al fatto che il *B. viridis* qui presentato fu liofilizzato appena catturato e l'altro venne tenuto per qualche tempo in laboratorio.

Comparazione tra i diagrammi: Una comparazione qualitativa tra i diagrammi che permette di seguire una omologia tra le diverse punte non ci è apparsa finora possibile. Tra i molti esperimenti fatti si illustra il seguente: il diagramma di emocianina ha una punta a 60, quello di albumina bovina del commercio una punta a 80. Il diagramma di una soluzione di emocianina al 0,5% in liquido di Weber ed Edsall mostra una sola punta a 60, quello di albumina bovina all'1% una punta a 80. Una soluzione di emocianina 0,5% ed albumina al 0,5% mostra due punte 50 e 80. La punta 80 è quella dell'albumina, la punta 50 è quella dell'emocianina che, in queste condizioni, pre-

(16) S. RANZI, P. CITTERIO e C. SAMUELLI, «Acta Embryol. Morphol. Exp.», 3, 65 (1960) (cfr. fig. 9).

cipita a più bassa concentrazione perché nel solvente c'è in definitiva anche l'albumina. Dopo la precipitazione dell'emocianina, l'albumina invece precipita alla concentrazione di ammonio solfato che la fa precipitare nelle soluzioni pure. Questo è come dire che nel tratto a sinistra dei diagrammi di « salting-out » una stessa proteina può precipitare anche a diversa concentrazione di ammonio solfato. Questo è probabilmente il caso della seconda punta di Uccelli e Mammiferi; questa incertezza rappresenta indubbiamente una difficoltà di valutazione dei dati per questa via.

Più agevole invece è apparsa una comparazione tra i diagrammi onde ottenere un valore indice della loro affinità; per questo abbiamo elaborato un metodo di comparazione. Il metodo consiste nel prendere lo stesso valore,

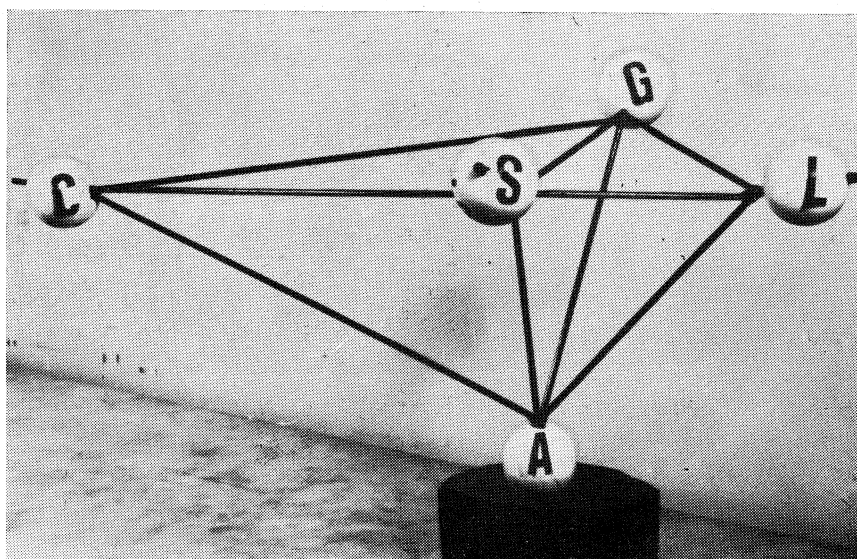


Fig. 16. - Diagramma spaziale della distanza sistematica osservata nei Molluschi.

A, *Chiton*; C, Cefalopodi; G, Gasteropodi; L, Lamellibranchi; S, *Dentalium*. = I valori di Cefalopodi, Gasteropodi e Lamellibranchi sono ottenuti facendo le medie tra tutti i diagrammi. Distanze A-C 256; A-G 139; A-L 139; A-S 145; C-G 256; C-L 300; C-S 270; G-L 137; G-S 141; L-S 121.

rispetto alle ascisse, di due diagrammi e dividere il più piccolo valore per il più grande; se i due valori sono zero non si tiene conto di questo quoziente. Si sommano tutti i quozienti che si ottengono dalla comparazione dei due diagrammi e si divide per il numero di quozienti utilizzati (solo i quozienti 0 : 0 vengono esclusi). Se si calcola in questa maniera, la comparazione tra due diagrammi identici è 1,0. La comparazione tra diagrammi simili dà un valore poco inferiore a 1,0. La comparazione tra diagrammi molto diversi dà valori dell'ordine di 0,5 o più bassi. Si può pertanto calcolare un valore che esprime l'affinità tra due animali; questo valore è 1,0 nel caso di identità e tanto più alto quanto più i due animali sono tra loro affini.

Alcuni valori trovati per i Vertebrati sono per esempio:

- Selaci tra loro 0,78;
- Teleostei tra loro 0,87-0,84;
- Selaci contro altri Pesci 0,72-0,69;
- Selaci in comparazione con Tetrapodi, 0,57-0,42;
- Storione in comparazione con altri Pesci 0,70-0,66;
- Storione in comparazione con Tetrapodi 0,62-0,48;
- Teleostei in comparazione con Tetrapodi 0,55-0,44;
- Urodeli tra loro 0,93-0,80;
- Urodeli in comparazione con Anuri 0,66-0,57;
- Urodeli in comparazione con Amnioti 0,63-0,34;
- Uccelli tra loro 0,89-0,73;
- Uccelli in comparazione coi Mammiferi 0,77-0,59.

Facendo $\frac{100}{\text{valore di affinità}} = \text{distanza sistematica}$, è possibile in alcuni casi costruire diagrammi che fanno vedere la distanza tra diversi gruppi zoologici. Un esempio è quello del diagramma qui presentato per i Molluschi nel quale il « salting-out » del *Chiton*, quello del *Dentalium* e i « salting-out » medi dei Gasteropodi, Lamellibranchi e Cefalopodi sono stati tra loro comparati e con la comparazione è stato costruito il modello della fig. 16.

Considerazioni: Se si prendono in esame i diagrammi di « salting-out » un primo fatto emerge: i diagrammi sono caratteristici di grandi gruppi animali. Quelli qui riconosciuti concernono: 1) Eunicidi, 2) Nereididi, Neftididi, Gliceridi, 3) Sedentari, 4) Oligocheti, Irudinei ed Echiuroidi, 5) Sipunculoidi, 6) Poliplacofori, 7) Gasteropodi, Scafopodi e Lamellibranchi, 8) Cefalopodi, 9) Crinoidi, Echinoidi, Ofiuroidi, 10) Asteroidi, 11) Oloturoidi, 12) Ascidiozoi, 13) Cefalocordati, Petromizonti, Pesci, 14) Urodeli, 15) Anuri, 16) Rettili, 17) Uccelli, 18) Mammiferi.

Si vede da quanto qui scritto che i diagrammi in questione corrispondono all'incirca alle Classi del sistema zoologico, salvo il caso dei Policheti. Lo studio di questi diagrammi si presta pertanto a qualche considerazione.

Prendiamo il caso dei Molluschi; in questo gruppo il diagramma del *Chiton* non differisce che per caratteri di dettaglio (piccola punta a 45, assenza della punta a 75 che però in parecchie forme manca) da quello di Gasteropodi, Scafopodi, Lamellibranchi. In questo gruppo forme marine di fondo, marine planctoniche, di acqua dolce e terrestri hanno lo stesso diagramma e pertanto crediamo si possano prendere i diagrammi dei Gasteropodi della fig. 5 come espressione del valore tassonomico dei diagrammi di « salting-out ». I diagrammi sono sovrapponibili prescindendo completamente da ogni differenza ecologica tra gli animali studiati. Questo significa che i caratteri di precipitazione delle proteine dipendono da condizioni genetiche molto primitive. Abbiamo parlato fin qui dei diagrammi di animali senza conchiglia, ma la stessa cosa si può dire per animali analizzati con conchiglia. Il diagramma dei Cefalopodi è

invece caratteristico senza differenze tra Decapodi e Octopodi. Ci sono quindi differenze profonde tra le proteine dei Cefalopodi e quelli degli altri Molluschi, differenze che si possono ricondurre ad una precoce separazione del gruppo, come anche il particolare sviluppo embrionale sembra indicare.

Se si considerano gli Echinodermi c'è anche qui un diagramma probabilmente primitivo, quello dei Crinoidi, Echinoidi, Ofiuroidi (le similitudini tra Echinoidi e Ofiuroidi sono state ben discusse da Samuelli e Pajetta, op. cit.) e due diagrammi che da esso si allontanano e rappresentano particolari differenziamenti proteici degli Asteroidi e degli Oloturoidi.

Se si considerano i Cordati vi è un diagramma, quello dell'anfioso, che sembra il diagramma originale. È ripetuto dallo storione, e, con piccole variazioni, da un lato nei Selaci, dall'altro nei Petromizonti e nei Teleostei. Vi sono poi due diagrammi uno per gli Anfibii Urodeli, l'altro per gli Anuri e diagrammi caratteristici per Rettili, Uccelli e Mammiferi, senza che si possa rilevare nulla di notevole circa le corrispondenze, se si eccettua una certa similitudine tra Uccelli e Mammiferi.

Se si prendono a considerare gli Anellidi si vede in essi un diagramma che è quello degli Echiuroidi, Oligocheti, Irudinei. Questo diagramma, con una punta in più, diviene il diagramma dei Sipunculoidi. I Policheti studiati presentano invece almeno tre diagrammi diversi da questo e diversi tra loro. Proviamo a tradurre questa osservazione in senso filogenetico: già la morfologia fa vedere i Policheti come un gruppo estremamente polimorfo; studiando il « salting-out » ci siamo imbattuti in almeno tre diversi diagrammi. Invece i diagrammi di « salting-out » mostrano un gruppo ben delimitato Echiuroidi-Oligocheti-Irudinei parente dei Sipunculoidi. Al punto in cui sono oggi le nostre ricerche il nesso tra questo grande gruppo e i Policheti sfugge.

SUMMARY. — *Salting-out diagrams applied to the study of the systematic zoology.* — The salting-out diagrams of lyophilized powders of adult animals are characteristic for the different zoological groups.

Sometimes these diagrams seem to be characteristic for the zoological classes. The diagrams of the animal commonly bred in the laboratory may be different from those of the wild animals of the same group.

The meaning of these findings is discussed.